

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公表

⑪ 公表特許公報 (A)

平1-502746

⑫ 公表 平成1年(1989)9月21日

⑬ Int. Cl.⁴
C 07 K 7/10
A 61 K 37/28
C 07 K 7/34
// C 07 K 99:00
99:34

識別記号
ZNA
ADP

庁内整理番号
8318-4H
8615-4C
8318-4H

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門 (区分) 3 (2)

97. 2. 12

(全 12 頁)

⑭ 発明の名称 インシュリン向性ホルモン

⑮ 特 願 昭62-502896

⑯ 出 願 昭62(1987)5月5日

⑰ 国際文提出日 昭63(1988)11月4日

⑱ 国際出 願 PCT/US87/01605

⑲ 国際公開番号 WO87/06941

⑳ 国際公開日 昭62(1987)11月19日

優先権主張 ① 1986年5月5日 ② 米国 (U S) ③ 859928

② 発 明 者 ハバナー、ジョエル

アメリカ合衆国マサチューセッツ02161、ニュートン・ハイランズ、プリマス・ロード217番

③ 出 願 人 ザ・ジェネラル・ホスピタル・コーポレーション

アメリカ合衆国マサチューセッツ02114、ボストン、フルート・ストリート (バー-3) (各地の表示なし)

④ 代 理 人 弁理士 青山 保 外2名

⑤ 指 定 国 AT (広域特許), BE (広域特許), CH (広域特許), DE (広域特許), FR (広域特許), GB (広域特許), IT (広域特許), JP, LU (広域特許), NL (広域特許), SE (広域特許)

請 求 の 項 目

1. 式:

Hle-Ala-Gly-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-
Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Glu-Ala-
Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-
Lys-Gly-Arg-Gly

で示される配列のペプチドフラグメント、並びにその機能的な誘導体であって、天然の不純物を實質的に含有せず、インシュリン向性活性を有するものである該フラグメントおよび該機能的な誘導体。

2. (1) 式:

H⁺N--X--CO-R¹

(式中、R¹はOH、OMまたは-NR²R³であって、ここにMは、基的に許容し得る陽イオンまたは低級分枝炭または非分枝炭アルキル基、R²およびR³は水素および低級分枝炭または非分枝炭アルキル基からなる群から選択される互いに同一または異なる基であり、Xは請求項1記載のペプチドフラグメントを意味す)で示されるペプチド、

(2) その酸付加塩、並びに

(3) 保護された、または部分的に保護された誘導体。

3. 式:

Hle-Ala-Gly-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-
Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Glu-Ala-
Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-
Lys-Gly-Arg-Gly

で示される配列を有する請求項1記載のペプチド。

4. 哺乳類の降B型島細胞に請求項1記載のインシュリン向性ペプチドの有効量を供給することからなるインシュリンの発現を促進する方法。

5. 哺乳類の降B型島細胞に請求項2記載のインシュリン向性ペプチドの有効量を供給することからなるインシュリンの発現を促進する方法。

6. 哺乳類の降B型島細胞に請求項3記載のインシュリン向性ペプチドの有効量を供給することからなるインシュリンの発現を促進する方法。

7. 請求項1記載のペプチドフラグメントの有効量と、インシュリン向性抗体としての使用に適した薬学上許容し得る担体とを含有する医薬組成物。

8. 請求項2記載のペプチドフラグメントの有効量と、インシュリン向性抗体としての使用に適した薬学上許容し得る担体とを含有する医薬組成物。

9. 請求項3記載のペプチドフラグメントの有効量と、インシュリン向性抗体としての使用に適した薬学上許容し得る担体とを含有する医薬組成物。

発明の名称

インシュリン向性ホルモン

発明の要旨

産業上の利用分野

本発明は、プレホルモン、プロダクトのある型のペプチドフラグメントがホルモン様活性を有し、ホルモン、即ちインシュリンの合成および分泌を刺激するのに使用し得るという発見に関するものである。これらのペプチドフラグメントは、糖尿病の治療に有用である。

従来技術と発明が解決すべき課題

肝臓の島(ランゲルハンス島)細胞における内分泌は血液-骨代謝(グルコース、アミノ酸、カテコールアミン等)のうならず、局所のパラクリンの影響等、複雑なコントロール下にある。主な肝島ホルモン(グルカゴン、インシュリンおよびソマトスタチン)は、それらに特異的な細胞型(すなわち、A、BおよびD型細胞)の間で相互作用

し、代謝物質によって伝達(mediate)される分泌応答を模倣(mimic)する。インシュリン分泌は、血中の糖(グルコース)濃度によって優先的にコントロールされているが、グルカゴンおよびソマトスタチンもグルコースによって伝達されるインシュリンの分泌応答を、すなわち、刺激および抑制する。既に提案されているインシュリン分泌に対する島内のパラクリン制御以外に、島内にもインシュリン向性因子が存在することを示す証拠がある。この概念は、経口摂取されたグルコースのインシュリン分泌刺激作用が、同等量の静脈内投与されたグルコースに比べてはるかに強いという実験結果に基いている。

ヒトホルモン、グルカゴンは、肝臓細胞で産生される29アミノ酸のペプチドホルモンである。このホルモンは、セクレチン、胃腸抑制性ペプチド、血管作用性ペプチドおよびグリセチン等、構造上、似通ったペプチドの、マルチ遺伝子ファミリーに属している。これらのペプチドは、炭水化物代謝、肝臓の運動性、および分泌工程等を互々に制御している。しかしながら、肝臓グルカゴンの基本的

な作用として認識されているのは、グリコーゲン分解と糖新生の促進作用であり、その結果としての血中血糖上昇作用である。このことに関連し、グルカゴンの作用はインシュリンと反対の制御効果を示し、糖尿病を伴った高血糖症をもたらすことになる[Diabetes Mellitus, リンドラ(Lund, P. K.) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 79:345-349(1982)]。

グルカゴンは、インシュリン産生細胞の表面に存在する特異的なリセプターと結合し得ることが見出された。これらのリセプターと結合すると、グルカゴンは該細胞を刺激してcAMPの迅速な合成をもたらす。次いで、cAMPが、インシュリン分泌を刺激することが見出された[コーマンら(Korman, L. Y.), Diabetes, 34:717-722(1985)]。インシュリンはグルカゴン合成阻害作用を有する[Review of Medical Physiology, ゲノング(Genong, W. F.), 1979, Lange出版, ロス・アトラス, カリフォルニア, p. 273]。このように、グルカゴンの発現は、インシュリンにより、完結的には血中血糖により、広範囲に制御されている。

グルカゴンの遺伝子は、まず、630塩基対の前駆体が翻訳されてポリペプチド、プレログルカゴンとなる(ルンドラ、1982)。次いで、このポリペプチドがプロセッシングされてログルカゴンになる。パフェルトら(Patzelt, C.), *Nature*, 282:260-266(1979)は、ログルカゴンがグルカゴンと第2のペプチドとに開裂されることを示した。ルンドラ(Lund, P. K.), ロペツラ(Lopez, L. C.)およびベルら(Bell, G. I.)(*Nature*)302:716-718(1983)は、リジン-アルギニンジペプチド残基の直ぐ後方でログルカゴン分子が開裂されることを示した。海賊ナマズ(*Ictalurus punctatus*)によって生成されたログルカゴンの研究において、この動物のグルカゴンも開裂するアルギニン-リジンジペプチド残基およびアルギニン-アルギニンジペプチド残基の直ぐ後方で開裂されることが示された[アンドリュウら(Andrews, P. C.), *J. Biol. Chem.*, 260:3910-3914(1985)]。ロペツラ(Lopez, L. C.)(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5485-5489(1983))およびベルら(Bell, G. I.)は、

ロペツラのGLP-1の大きさに関する結論はワテンタルら(Wathen, L. O.)(*J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 61:472-479(1985))によって追認された。ワテンタルらは、ヒト膵臓に存在するGLP-1の分子型を調べた。彼等の研究により、GLP-1およびGLP-2は、実々、37アミノ酸および34アミノ酸からなるペプチドとして膵臓に存在していることが示された。

GLP-1とグルカゴンとの類似性は、多くの初期の研究者に、GLP-1にも生物学的活性が存在し得るという印象を与えていた。ある研究者達は、GLP-1がラット膵臓のcAMP合成を誘発し得ることを見出した[フーサインら(Hoosier, N. M.), *Febs. Lett.*, 178:83-86(1984)]が、他の研究者達はGLP-1になんらの生理学的作用を同定することもできなかった(ロペツラ)。GLP-1の生理学的作用の同定における失敗は、研究者達に、GLP-1が実際にホルモンであるか否か、およびグルカゴンとGLP-1との近縁関係は人為的なものではないかという疑問を抱かせた(ギブソンら)。

哺乳類のログルカゴンは、リジン-アルギニンジペプチドまたはアルギニン-アルギニンジペプチドの両方で開裂されること、並びに、ログルカゴン分子は3つの異なる、高度にホモロジーなペプチド分子、即ち、グルカゴン、グルカゴン様タンパク質1(GLP-1)およびグルカゴン様タンパク質2(GLP-2)を含有していることを示した。ロペツらは、グルカゴン様タンパク質1は37アミノ酸残基の長さであってグルカゴン様タンパク質2はアミノ酸残基34の長さであると結論した。ラットのプレログルカゴンの開裂に関する同様の研究でも、タンパク分解的開裂のパターンについて、開裂するリジン-アルギニンジペプチドか、アルギニン-アルギニンジペプチドの間で開裂され、グルカゴン、GLP-1、およびGLP-2が生成されることが分った[ハインリッヒら(Heinrich, G.), *Endocrinol.*, 115:2176-2181(1984)]。ヒト、ラット、ウシおよびハムスターのGLP-1の配列は同一であることが分った[ギブソンら(Gibson, M.), *Diabetologia*, 27:599-600(1984)]。

結局、従来技術では、グルカゴンホルモンの前駆体がプロセッシングされて、広範囲にわたってホモロジーな1つのペプチドが生じることが認識されたことになる。当該技術分野における多くの人々が、これらの高度に関連しているグルカゴン様ペプチドには当然生物学的活性があると考えていた。にもかかわらず、これら分子の生物学的作用の解明を目指した多くの研究者が不成功に終わったのである。

発明の要約

ホルモングルカゴンは、高分子量の前駆体として合成され、それがタンパク分解的に開裂されて3つのペプチド、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド1(GLP-1)およびグルカゴン様ペプチド2(GLP-2)となることが知られている。GLP-1は、プロセッシングされない状態では37アミノ酸からなる。本発明は、未プロセッシングGLP-1が自然に、GLP-1の7-37アミノ酸を有する31アミノ酸長のペプチド(7-37ペプチド)に生成されることを暗示するものである。このプロセッシングは、膵臓および肝臓

内で起こる。この7-37ペプチドはこれまで報告されたことのないインシュリン同位(インシュリノトロピック)ホルモンである。このホルモンの作用は降血糖に特異的であり、β細胞のインシュリン合成を誘導すると思われる。プロセッシングされていないGLP-1は、本質的に、インシュリンの合成の誘発を促進することができない。このインシュリン同位ホルモンは、インシュリン分泌の動力学が異常になっている、成年期発現性の糖尿病の病因研究に有用である。

図面の簡単な記述

第1図は、ヒト、ラットおよびハムスターのプレログルカゴンのDNA模造および対応するアミノ酸配列を示す模式図である。プレログルカゴンは、丸で示した部位でタンパク分解的に切断される。

第2図はラットβ細胞の細胞内RNAレベルに対するGLP-1ペプチドの影響を示す図である。

第3図はラットβ細胞の細胞内アンジオテンシノーゲンRNA

産生される状態を示すものである。本明細書中、GLP-1(1-37)という表記は1(N末端)から37(C末端)までの全アミノ酸を含有するGLP-1ポリペプチドを指す。同様に、GLP-1(7-37)は、7(N末端)から37(C末端)までの全アミノ酸を含有するGLP-1ポリペプチドを意味する。

1つの実施態様では、ペプチド断片は、メリフィールド(Merrifield, J. M.)(Chem. Soc., 85:2149(1962))およびスチュワート(Stewart)およびヤング(Young)(Solid Phase Peptide Synthesis, (Freeman, San Francisco, 1969), 27-66頁)記載の周知の固相ペプチド合成法で合成する。しかしながら、タンパク分解的な酵素を用い、天然に存在するアミノ酸を断片化してプロログルカゴンポリペプチドまたはGLP-1断片を得ることもできる。さらに、マニァティス(Mannatis, T.)(Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY 1982)の記載による模造DNA技術を用いてプロログルカゴンペプチドの所望の断片を得ることもできる。

レベルに対するGLP-1ペプチドの影響を示す図である。

第4図はラットβ細胞の細胞内アングテンRNAレベルに対するGLP-1の影響を示す図である。

第5図は、GH4細胞内プロラクチンRNAレベルに対するGLP-1(1-37)の影響を示すX線図である。

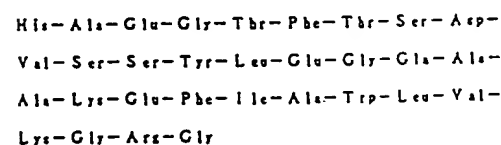
第6図は、A1T-20細胞内ACTH RNAレベルに対するGLP-1(1-37)の影響を示す図である。

好ましい実施態様

決定されたヒトGLP-1のアミノ酸配列から選択されたペプチド断片(断片)は本発明を含む開発の出発物質である。GLP-1のアミノ酸配列は、数人の研究者によって報告されている[ロベラ(1983)、ベル(Bell, G. I.)(Nature, 302:716-718(1983)、ハインリッヒ(1984)、ギグリオニ(1984)]。プレログルカゴン遺伝子の模造および対応するアミノ酸配列を第1図に示す。この図面は、前駆体遺伝子がタンパク分解のプロセッシングを受けてグルカゴンと2つのグルカゴン様ペプチドが

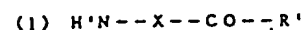
本発明は、天然に存在するアミノ酸配列から誘導された、インシュリン同位のペプチド断片を提供するものである。

本発明は、式:



で示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片、並びにその機能的な誘導体であって、実質上、天然の不純物を含み、インシュリン同位作用を有するものを提供するものである。

特に興味深いペプチドは、式:



[式中、R¹はOH、OMまたは-NR²R³であって、ここに、Mは数学的に許容し得る陽イオンまたは低級(C₁-C₄)分枝炭または非分枝炭アルキル基、R²およびR³は水素および低級(C₁-C₄)分枝炭または非分枝炭アルキル基からなる群から選択される互いに同一または異なる基、Xは上記のアミノ酸配列またはペプチドフラグ

メントを要す)

で示されるペプチド、

(2)その置付加塩、並びに

(3)その保護された、または部分的に保護された誘導体である。

本発明は、インシュリンの発現を促進する方法であって、哺乳類の胚B型島細胞に、有効量の上記インシュリン向性ペプチドを与えることからなる方法を提供するものである。

本発明範囲には、インシュリン向性ホルモンとして機能し得る上記ペプチド中のアミノ酸配列も含まれる。また、担体タンパク質、またはインシュリン向性効果を向上するために加えられるアミノ酸残基との結合(カップリング)を促進するのに用いられる付加的なアミノ酸も含まれる。ある物質は、正常な天然状態で該物質に相伴して見出される物質から精製されていれば、それは、「実質上、天然の不純物を含有しない」と言われる。G L P-1(7-37)に伴う天然の不純物の例として、他のペプチド、炭水化物、グリコシル化されたペプチド、脂質および脂質物質等がある。また、ある物質

はインシュリン向性活性を示すことを条件として、「機能的誘導体」と表現される。

「インシュリン向性活性(作用)」とは、ホルモンインシュリンの合成または発現を刺激する能力、あるいは、刺激を引き起こす能力に関連する括弧である。

当業者ならば分かることであるが、アミノ酸残基は、適当なアミノ保護基またはカルボキシ保護基を用いて、保護された形または保護されていない形のいずれをもとり得る。有用な陽イオンは、アルカリ金属陽イオンまたはアルカリ土類金属陽イオン(例えば、Na、K、Li、1/2Ca、1/2Ba等である)、またはアミン陽イオン(例えば、アルキル基がC₁-C₁₀の、テトラアルキルアンモニウム、トリアルキルアンモニウム等である)。

様々な長さのペプチドは、逆順アミノ形(N末端)またはその置付加塩の形でよい。一般的な置付加塩は、ハロゲン化水素塩、即ち、HBr、HIより好ましくは、HClの塩である。

化合物のインシュリン向性は、該化合物を動物細胞に与えるか、

特許平1-502746(5)

の試料(サンプル)中にこれらの不純物が含有されていないときにも、

その物質は、実質上、天然の不純物を含有しないとされる。

相互に交換可能な語句、「ペプチド断片」と「ペプチド部分」は、いづれも、天然に存在するアミノ酸配列から導かれる、合成および天然に存在するアミノ酸配列誘導体の両方を包含する意味で用いられる。

ペプチドは、それを天然に存在する配列を断片化して得ることができる場合、あるいは天然に存在するアミノ酸配列の配列に関する知識、または該配列をコードしている遺伝物質(DNAまたはRNA)に関する知識に基いて合成し得る場合には、「天然に存在する配列から誘導された」と表現される。

さらに本発明は、選択された配列のもの以外に、天然に存在する配列中には含まれていない1またはそれ以上のアミノ酸が付加され、あるいは欠失されたポリペプチドであって、選択されたポリペプチドと同様の機能を有するポリペプチドにも関するものである。それら本発明のポリペプチドはG L P-1(7-37)と実質上、同

動物に注射し、それぞれ、短期または動物の荷重系への免疫反応性のインシュリン(IRI)の放出を監視することにより決定される。IRIの存在は、インシュリンを特異的に検出し得るラジオイムノアッセイを用いて検出することができる。IRIの存在を検出し得るラジオイムノアッセイであれば、どれを採用してもよいが、アルバノら(Albano, J. M. D.)(Acta Endocrinol. 70:487-509(1972))の分析法を改良した方法が行ましい。この改良法では、ホスフェート/アルブミン(pH 7.4)緩衝液を用いる。ウシ脳液500ul、パーフセエート(perfusate)試料液500ulまたはパーフセエート中ラットインシュリン標準液500ul、灰インシュリン試血清1000ul(Wellcome Laboratories, 1:40,000希釈)、および[¹²⁵I]インシュリン1000ulを、10×75mmの使い捨てガラス管内で全量750ulとし、連続的な条件下でインキュベーションを行った。4で2-3日間インキュベーションした後、反常分離法によって、逆順のインシュリンを、抗体と結合したインシュリンから分離した。アッセイの感度は1-2μU/mlであった。

細胞培養中で培養した細胞の培養中に放出されたIRIを測定するために、放射活性に標識したプロインシュリンを導入することが好ましい。ポリペプチドをラベリング(標識すること)し得る放射活性は標識ならば何でも使用可能であるが、¹²⁵Iロイシンを用いては標識化プロインシュリンを調製することが好ましい。ラベリングは、放出可能に標識されたプロインシュリン分子のプールを形成するのに十分な期間(時間)をかけて行えばよいが、放射活性は標識の存在下、細胞を60分間インキュベートすることが好ましい。化合物が、インシュリン同姓作用を有するか否かの決定には、インシュリンを免疫し得る細胞ならば何でも利用できるが、ラットの島細胞種細胞、および、特に、RIN-3Bラット島細胞種細胞を用いることが好ましい。そのような細胞は、適当なあらゆる培養地で培養し得るが、0.1%BSAおよび25mMグルコースを含有するDMEM培養地を用いることが好ましい。

化合物のインシュリン同姓特性は、精製出によっても求められる。凍結したラット胚製品を自体そのままで凍結して、改良ベジネス法

avertical., 54:1403-1412(1974))に従って解析した。

本発明の化合物は、既知の薬学的に有用な組成物調製法に従い、GLP-1(7-37)またはその機能的な誘導体を薬学的に許容し得る担体賦形剤と混合して製剤化することができる。適当な賦形剤およびその製剤としては、他のヒトペプチド、例えば、ヒト血清アルブミン等がレミントンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences(第16版オスロ(A. Oslo)版, Mack, Easton PA(1980))に記載されている。効果的な投与に適した薬学上許容し得る組成物が得られれば、そのような組成物は、GLP-1(7-37)またはその機能的な誘導体を適量の担体賦形剤と一緒に含有しているであろう。

GLP-1(7-37)またはその機能的な誘導体を含有する組成物は、注射内、筋肉内、または皮下から、約1μg/kg(体重)~1.000μg/kg(体重)の範囲の用量で投与されるが、それ以下またはそれ以上の用量を用いることもできる。必要とされる用量は、患者の

(Pashor, J. C.)(Diabetes, 18:733-738(1969))とされた。絶食させた雄性チャールス・リバー白子ラット(体重350-600g)を、アミナール・ナトリウム塩(Amital Sodium, Eli Lilly and Co., 160mg/kg)の腹腔内注射によって麻酔した。腎臓、心臓、肝臓、および下方腸胃の血管を結紮した。十二指腸約4cm、下行結腸および直腸以外の全腸管を摘出した。従って、腸の大部分が凍結されたにすぎず、グルカゴン様免疫反応性を有する腸性物質による干渉を最小限に止めることができた。凍結は、4%デキストランT70および0.2%ウシ血清アルブミン(フラクシオンV)を含有する改良クレブスーリンゲル重炭酸緩衝液を用い、95%O₂および5%CO₂を吹き込んで行った。非バルス(博動)性凍結の4波路(チャンネル)ローラーベアリングポンプ(パッチェラー・ポリステティック(Buchler Polystatic)Buchler Instruments Division, Nuclear-Chicago Corp.)を用い、一方の凍結液からもう一方への切り替えを3方向コック(蛇口)で行った。凍結の完了の様子を監視し、ワイアーの方針(Weir, C. C.)(J. Clin. I

症状の重篤度、および患者の身長、体重、性、年齢、および病歴等の判断基準により左右される。

非投与のための、GLP-1(7-37)含有組成物を滅菌水に溶かし、pH値を約6-8に調節する。凍結乾燥工程を促進し、て適当な生薬物を得るためには、ラクトースを溶液に加えるとよい。次いで、得られた溶液を滅菌透過し、バイアルに入れ、凍結乾燥する。これらの組成物中のGLP-1(7-37)の濃度は10⁻¹¹Mから10⁻¹⁰Mの間で変化し得る。

さらに他の薬学的手法を用いて作用の持続性をコントロールすることもできる。放出コントロール製剤は、GLP-1(7-37)またはその機能的な誘導体とコンプレックスを形成するか、それを吸着するポリマーを用いて得ることができる。到達のコントロールは、放出をコントロールするための、適当な高分子(例えば、ポリニステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、ニチレンジメチル、ノチルセルロース、カルボキシノチルセルロース、および凍結プロテイン等)、高分子の濃度、および導入方法を選択することにより

実行される。放出コントロール技術によって作用の特異性をコントロールするための別法は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ(乳酸)、またはエチレンと酢酸ビニルの共重合体等のポリマー原料の粒子にGLP-1(7-37)を導入することからなる。別法として、これらのポリマー粒子にGLP-1(7-37)を導入する代りに、例えば、元々、ヒドロキシメチルセルロース、またはゼラチン-マイクロカプセルおよび(メチルメタクリレート)マイクロカプセル等の、コアセルベーション技術または界面重合法によって調製されたマイクロカプセルにGLP-1(7-37)を捕獲させるか、あるいは、リボソーム、アルブミン複合体(マイクロスフェア)、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル等のコロイド状薬物供給系(デリバリーシステム)、またはマクロエマルジョン中に取り込ませることができる。そのような方法は、Renzlax's Pharmaceutical Sciences(1980)に記載されている。

具体的実施例

および細胞をグアニジンチオシアネート中でホモジナイズし、塩化セシウムフラクション中で沈降させることにより、細胞性RNAを抽出した。オリゴdTセルロース・クロマトグラフィーによってpoly A⁺RNAを単離した[アビブら(Aviv, H.) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 69:1408-1412(1972)]。各試料から得た全RNA 20 μ gを、グリオキサール中で変性した後、1.4%アガロースゲル電気泳動にかけてサイズ分離し、次いで、ナイロン・メンブラン(Nytran; Schleicher and Schuell)に電気的に移した。ブロッティングした(はん点の付いた)メンブランを減圧下、80℃で2時間焼き、1M NaCl/1% SDS/10% 硫酸デキストラン中、50℃で一晩、プレハイブリダイズした後、標識したプローブ(3-5 \times 10⁶cpm/ μ l)を加え、同温で24時間ハイブリダイズさせた。次いで、1 \times SSC(0.15M NaCl/0.015M 硝酸ナトリウム)/1% SDS中で55℃において2回洗浄し、-70℃において、様々な時間、強化スクリーンを用いてX線フィルムに露出させた。全てのケースでプローブ濃度は10⁻⁶Mであった。

実施例1

移植可能なラットの島細胞株(ガブーら(Gadur, A. F.), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77:3519-3523(1980))から自立された連続的な細胞系(セルライン)、RIN-p₁から、細胞系RIN-38、ラット島細胞株細胞を得た。この細胞を、10%胎牛血清(胎児血清(Gibco)、ペニシリン100U/ μ lおよびストレプトマイシン100 μ g/ μ lを補充した、グルコース濃度4,500 μ g/LのDMEM(Gibco)中に維持した。空気9.5%、二酸化炭素5%中、37℃でインキュベーションを行った。上記の方法の下で増殖した細胞を洗浄し、0.1%ウシ血清アルブミンと25 μ Mグルコースとを含有するDMEM(Gibco)に両断した。様々な濃度のGLP-1(1-37)、GLP-1(7-37)またはGLP-1(7-36 des-gly-arg)と一緒に6時間インキュベートした後、これらの物質の内、どれがインシュリン α RNAの発現に影響を及ぼすかを決定した。以下のごとくにして、細胞性RNAをインシュリン特異的 α RNAにつき、分析した。図形顯像

この実験の結果を第2図に示す。レーン1-3(対照細胞)、4-6(GLP-1(1-37))、7-9(GLP-1(7-37))、10-12(GLP-1(1-36 des-gly-arg-side))は、産生されたインシュリン特異的 α RNAの量を示している。各ベブナドについて、3回の繰り返しの実験の結果が示されている。

マイクロデンシトメーターを用い、インシュリン特異的 α RNAの相対量を求めた。この実験により、同一ベブナド濃度において、GLP-1(1-37)は、対照(非処理)細胞より3倍以上高く、インシュリン遺伝子の発現を刺激することが分かった。

実施例2

細胞系RIN-38のラット島細胞株細胞を実施例1記載のごとく、DMEM培養液中で培養した。10⁻⁶MのGLP-1(1-37)、GLP-1(7-37)およびGLP-1(1-36)と一緒にインキュベートした後、細胞培養液中のインシュリン濃度をラジオイムノアッセイ(既述)によって測定した。6時間インキュベートした後、インシュリンタンパク質濃度を測定した。実験結果を表1に示す。

表 1

加えられたペプチド	インシュリン生産量 (マイクロユニット/鼠)
なし	2800
GLP-1(1-37)	5000

実験例3

生存ラットの断頭を、上記のごとく、様々な濃度のGLP-1(1-37)およびGLP-1(7-37)で処理した。1分間隔で、ラジオイムノアッセイ(上記)によってラットの血清インシュリン濃度(ピコグラム/鼠、pg/鼠)を測定した。この実験の結果を表2に示す。濃度は、ペプチド濃度、 5×10^{-11} M、 5×10^{-10} M、 5×10^{-9} M、 5×10^{-8} M、および 5×10^{-7} Mで行った。0分の血清中濃度測定後、ペプチドを加えた。

GLP-1(1-37)は、濃度 5×10^{-11} Mでラットの断頭に処理すると、血清中のインシュリン濃度の3.4倍増を伝送することが分かった。このペプチドは、濃度 5×10^{-10} Mでは、血清中インシュリン濃度の2倍増を伝送し得たにすぎない。また、濃度 5×10^{-9} Mでは、このペプチドは血清中インシュリン濃度を20%

またはデルタ細胞には作用しないといえる。

表 2

ペプチド濃度に対するインシュリン生産(pgs/鼠)

時間(分)	5×10^{-11} M	5×10^{-10} M	5×10^{-9} M	5×10^{-8} M	5×10^{-7} M
0	50	975	205	160	50
GLP-1 (1-37) 1	6800	20700	7400	2100	50
2	4700	10500	1800	1700	50
3	1700	4000	760	1900	98
0	1400	3000	500	340	50
GLP-1 (1-37) 1	4700	6000	600	180	50
2	2900	2000	640	230	160
3	2200	2000	430	340	50

実験例4

グルカゴン様タンパク質が細胞性cAMP濃度に影響を及ぼし得るか否かを調べるために、RINS-38細胞断頭細胞におけるcAMP濃度に対するGLP-1(7-37)およびGLP-1(1-37)の影響を調べた。実験例1記載のごとくにして26ウェルの培養皿中で細胞を培養した。培養ウェルに、様々な量のグルカゴン様ペプチドを加え、3回繰り返した。10分間インキュベーションを行った後、全細胞培養液をcAMPについて検出し、cAMP濃度を

増加させただけである。

GLP-1(7-37)は、濃度 5×10^{-11} Mでラットの断頭に供給されると、血清中のインシュリン濃度の132倍増を刺激することが分かった。 10^{-10} 倍低い濃度(5×10^{-11} M)では、このペプチドは、インシュリンの血清中濃度の21倍増を命令することができるにすぎなかった。濃度 10×10^{-11} Mでは、GLP-1(7-37)は、血清中インシュリン濃度の増加を伝送することができた(32倍)。 5×10^{-11} Mでも、GLP-1(7-37)は、インシュリン濃度を15倍増加させることができたが、GLP-1(1-37)は無効であった。

この実験は、GLP-1(7-37)が、インシュリンのインビボ発現の刺激作用に関してGLP-1(1-37)の1,000倍以上の効力を有することを示している。しかも、これらの同じ実験において、GLP-1ペプチドは、ペプチドホルモングルカゴンおよびソマトスタチンの放出に何の作用も示さなかった。このように、GLP-1の刺激作用は、ベータ細胞に特異的であり、断頭のアルファ

測定した。この実験の結果を表3に示す。各培養液20μlを分析した。

表 3

発生されたcAMPのピコモル

ペプチド濃度(M)	実験1	実験2
0	140	91
10^{-11}	400	170
10^{-10}	370	120
10^{-9}	494	160
10^{-8}	515	100
10^{-7}	253	90
10^{-6}	533	90

この実験により、GLP-1(7-37)は、濃度 10^{-11} Mで存在する場合にも、cAMP濃度を刺激することが分かった。cAMP濃度の増加はGLP-1(7-37)が細胞レセプターと相互作用し得ることを示唆するものである。

実験例5

GLP-1(1-37)、GLP-1(1-36)およびGLP-1(7-37)の作用がインシュリンに特異的であらう、非特異的な低分子発現を誘導または刺激することがないことを証明するために、

表 4

RINS-38島細胞系における、インシュリン、アクチンおよびアンジオテンシノーゼンをコードするmRNAの細胞内濃度に対するグルカゴン様ペプチドの影響

GIF ⁴	mRNA		
	(77,17)	1117	77(17771-17)
GLP-1(1-37)	4.13±0.74	0.82±0.08	2.78±0.46
GLP-1(1-31)	1.87±0.56	0.91±0.02	2.25±0.20
GLP-1(1-36)des-Gly _{arg}	2.78±0.80	0.88±0.03	2.56±0.22
アルギニンアミド対照(非ペプチド)	1.18±0.23	0.89±0.05	2.67±0.31

実験例6

GLP-1(1-37)が、インシュリン以外のホルモンの生合成を誘導するか否かを決定するために実験した。即ち、GLP-1(1-37)(濃度10⁻¹¹M)をラットのグルカゴン産生性の島細胞系および、夫々、ホルモンであるプロラクチンおよびACTHを産生する2つの腺下垂体細胞系(GH4およびAIT-20)に加え、実験例1記載のごとく、24時間後に産生されたホルモン特異的mRNAの量を測定した。GLP-1ペプチドと一緒にインキュベーションした後の、GH4腺下垂体細胞内のプロラクチンmRNA

これらのペプチドの、アクチンおよびアンジオテンシノーゼンのmRNAの濃度に対する影響を調べた。実験例1に記載のごとくにしてRINS-38島細胞系細胞を培養し、GLP-1(1-37)、GLP-1(7-37)またはGLP-1(1-36)des-Gly_{arg}(Pecilassa Laboratories)の存在下にインキュベートした。ペプチド濃度は全て10⁻¹¹Mであった。インキュベーション時間は6時間であった。インシュリン、アクチンまたはアンジオテンシノーゼンに特異的なmRNAを実験例1記載のごとく、ノーザンハイブリダイゼーションによって測定した。この実験の結果を第2図(インシュリンmRNA)、第3図(アンジオテンシノーゼンmRNA)および第4図(アクチンmRNA)に示す。第2、3および4図のRNAゲルの走査(スキャニング)フィルムから得た人為的な濃度計単位でmRNA濃度を決定した。mRNA濃度を表4に示す。

濃度を第5図に示す。また、GLP-1ペプチドと一緒にインキュベーションした後の、AIT-20腺下垂体細胞内のACTHmRNA濃度を第6図に示す。これらの実験の結果、GLP-1(1-37)は、これらのペプチドホルモンをコードしているmRNAの量になんらの検出可能な影響を及ぼさないことが分かった。

実験例7

GLP-1(7-37)のRINS-38島細胞系細胞におけるインシュリン遺伝子およびアクチン遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。遺伝子の転写速度は、対照およびTPA処理細胞由来の核内での発現期のグルカゴンおよびベータアクトチンのRNA転写物を定量的にすることによって決定された。核内RNAを、ニトロセルロースに結合させた、過剰量のクローニングした特異的DNAとハイブリダイズさせ、フィルターを洗浄した[マックナイトら(McKnight, C. S.), J. Biol. Chem. 254:9050-9058(1979)]。ラットグルカゴン[ハインリッヒら(Heinrich, G.), Endocrinology 115:1-6(1984)]および、対照として、ニワトリのベータ

アクトチンcDNA[クリーブランド博士(Dr. D. Cleveland), ジョージア工科大学工学部、ボルネオ、ノアリーランドから提供されたもの]を用いた。ハイブリダイゼーション効率を、[³H]UTPグルカゴンcDNAのハイブリダイゼーション溶液を加えることによってコントロールした。実験を2回行い、結果をcDNA挿入体のppm/kbとして表し、ハイブリダイゼーション効率について校正した(40-50%)。細胞を、濃度10⁻¹¹MのGLP-1(7-37)と一緒に4時間インキュベートした。0、1、および4時間目に核を細胞から調製し、発現期のインシュリン遺伝子転写およびアクチン遺伝子転写物の分析におけるニュークレアーラン(nuclear reagent)により昇圧した(McKnight, C. S. ら)。この実験の結果を表5に示す。実験結果から、GLP-1(7-37)が、インシュリン遺伝子の転写を増大させるが、アクチン遺伝子の発現には検出可能な効果を示さないことが分った。

表 5
グルカゴン様ペプチド I (7-37) の、RINS-38 5 塩基配列
両端中でのインシュリンおよびアクチン遺伝子の転写に及ぼす影響

時間(時間)	インシュリン遺伝子	アクチン遺伝子
0	17.4	34.1
1	76.2	29.9
4	9.0	25.0

Fig.2

本明細書には本発明の全容が記載されているので、当該技術分野
における通常の技術者が仮かな推察を施して同様のことを行うこと
ができ、それらも本発明の技術思想に包含されることは明らかであ
る。

対照 1-37 7-37 1-36

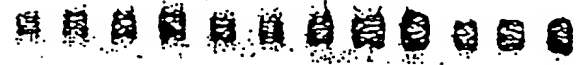


Fig.1

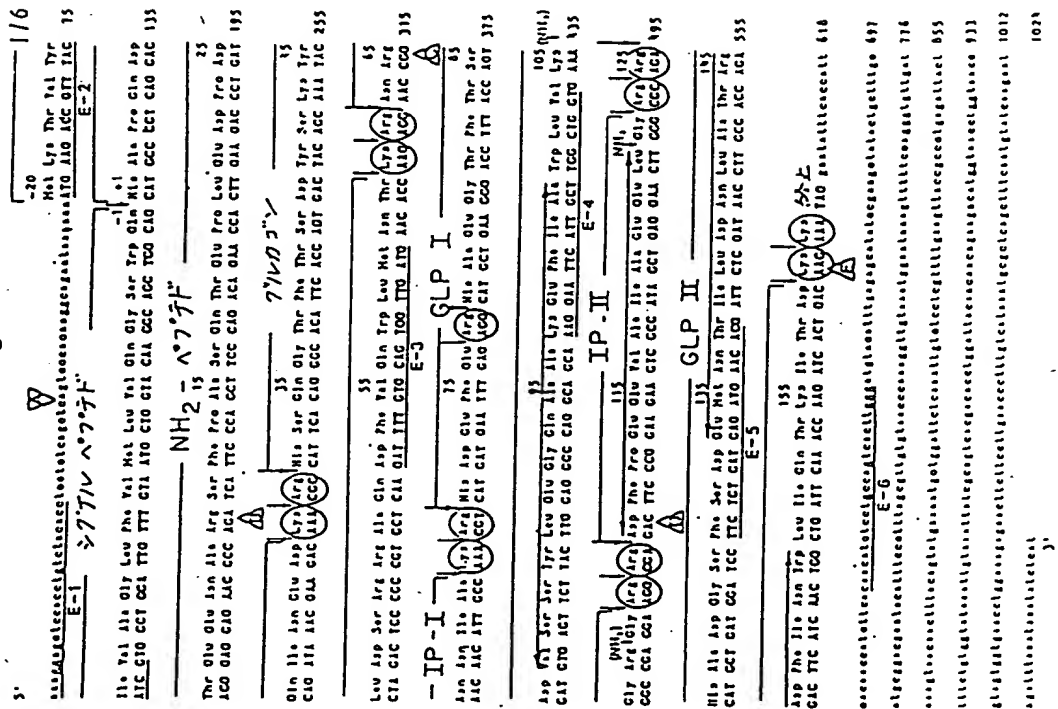


Fig. 3

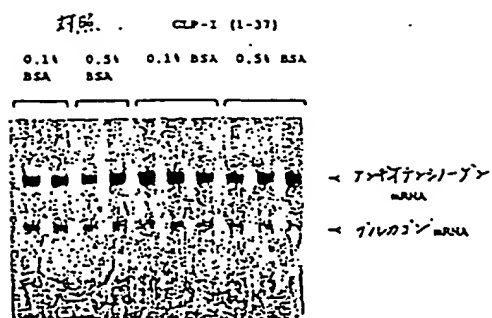


Fig. 4

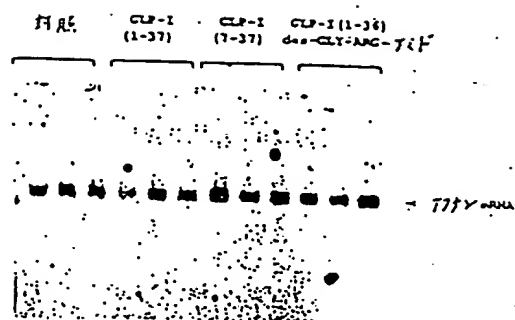


Fig. 5

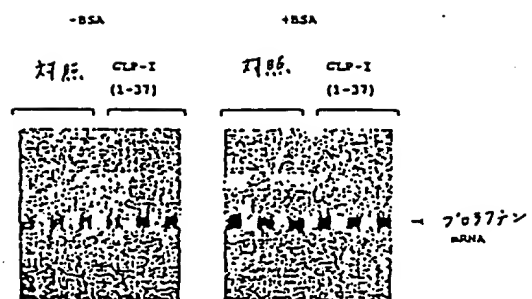
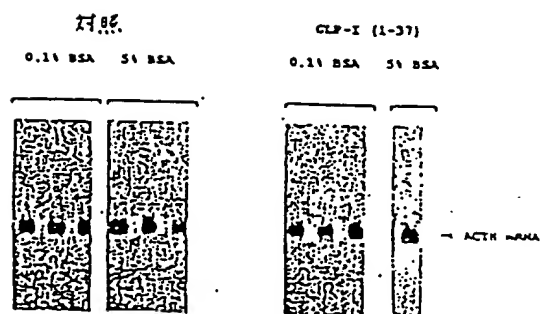


Fig. 6



U.S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1967 O 371-003	
INTERNATIONAL CONFERENCE ON SCIENTIFIC PAPER PRESENTATION 1966, 1967, 1968, 1969, 1970, 1971, 1972, 1973, 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 26	

[illegible]